



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109897100 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910222072.3

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2014.05.12

代理人 史文静 黄革生

(30)优先权数据

13/892,805 2013.05.13 US
PCT/US2013/040755 2013.05.13 US
PCT/US2013/040766 2013.05.13 US
61/888,259 2013.10.08 US

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C12N 5/0783(2010.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201480027071.9 2014.05.12

(71)申请人 瑟勒提斯公司

地址 法国巴黎

(72)发明人 R·加列多 J·史密斯

A·沙恩贝格 C·西弗-曼尼奥伊

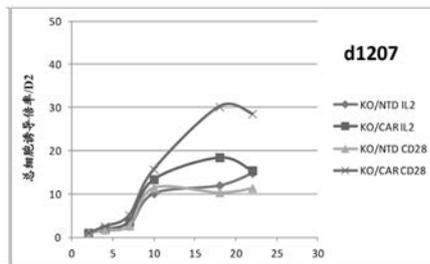
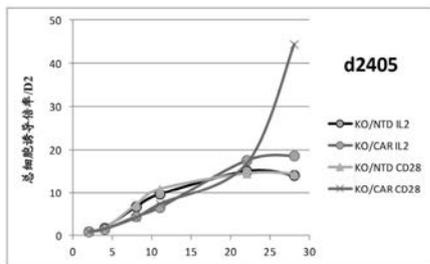
权利要求书2页 说明书19页
序列表24页 附图6页

(54)发明名称

CD19特异性嵌合抗原受体及其用途

(57)摘要

本发明关于嵌合抗原受体(CAR)。CAR能够利用配体结合结构域性质再导免疫细胞对选定靶标的特异性及反应性。特别地,本发明关于其中胞外配体结合为衍生自CD19单克隆抗体(优选4G7)的scFV的嵌合抗原受体。本发明亦关于编码所述CAR的多核苷酸、载体及在其表面表达所述CAR的分离的细胞。本发明亦关于改造在其表面表达4G7-CAR的免疫细胞而赋予经转导的细胞延长的“活化”状态的方法。本发明尤其适用于治疗B-细胞淋巴瘤及白血病。



1. 一种组合疗法,其包含:
 - (a) 表达CD19特异性嵌合抗原受体 (CAR) 的工程化T细胞;和
 - (b) 抗体。
2. 权利要求1的组合疗法,其中抗体是CAMPATH抗体。
3. 权利要求1的组合疗法,其中CD19特异性CAR包含至少一个细胞外配体结合结构域,跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域。
4. 权利要求3的组合疗法,其中CD19特异性CAR的细胞外配体结合结构域包含SEQ ID NO:7或8的氨基酸序列。
5. 权利要求3的组合疗法,其中CD19特异性CAR的至少一个细胞内信号传导结构域是包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CD3 ζ 信号传导结构域。
6. 权利要求3的组合疗法,其中CD19特异性CAR的跨膜结构域包含人CD8 α 链跨膜结构域和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的茎部结构域。
7. 权利要求3的组合疗法,其中CD19特异性CAR包含第二细胞内信号传导结构域。
8. 权利要求7的组合疗法,其中第二细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
9. 权利要求1的组合疗法,其中CD19特异性CAR包含SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列。
10. 权利要求1的组合疗法,其中所述工程化T细胞已经对至少一种免疫抑制剂产生抗性。
11. 权利要求10的组合疗法,其中由于编码免疫抑制剂受体的基因的失活,所述工程化T细胞对至少一种免疫抑制剂具有抗性。
12. 一种治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括:
 - 给受试者施用免疫抑制或免疫消除治疗;和
 - 给受试者施用表达CD19特异性嵌合抗原受体 (CAR) 的工程化T细胞。
13. 权利要求12的方法,其中免疫抑制或免疫消除治疗允许在受试者内选择和扩增工程改造的T细胞。
14. 权利要求12的方法,其中免疫抑制或免疫消除治疗包括用CAMPATH抗体治疗。
15. 权利要求12的方法,其中所述工程改造的T细胞已经对至少一种免疫抑制剂产生抗性。
16. 权利要求15的方法,其中由于编码免疫抑制剂受体的基因的失活,使得工程改造的T细胞对至少一种免疫抑制剂具有抗性。
17. 权利要求12的方法,其中CD19特异性CAR包含至少一个细胞外配体结合结构域、跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域。
18. 权利要求17的方法,其中CD19特异性CAR的细胞外配体结合结构域包含SEQ ID NO:7或8的氨基酸序列。
19. 权利要求18的方法,其中CD19特异性CAR的至少一个细胞内信号传导结构域是包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CD3 ζ 信号传导结构域。
20. 权利要求17的方法,其中CD19特异性CAR的跨膜结构域包含人CD8 α 链跨膜结构域和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的茎部结构域。
21. 权利要求17的方法,其中CD19特异性CAR包含第二细胞内信号传导结构域。

22. 权利要求21的方法,其中第二种细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

23. 权利要求12的方法,其中CD19特异性CAR包含SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列。

CD19特异性嵌合抗原受体及其用途

[0001] 本申请为2014年5月12日提交的、发明名称为“CD19特异性嵌合抗原受体及其用途”的PCT申请PCT/EP2014/059662的分案申请,所述PCT申请进入中国国家阶段的日期为2015年11月12日,申请号为201480027071.9。

发明领域

[0002] 本发明关于嵌合抗原受体(CAR)。CAR能够利用配体结合结构域性质再导免疫细胞对选定标靶的特异性及反应性。特别地,本发明关于其中胞外配体结合为衍生自CD19单克隆抗体(优选4G7)的scFv的嵌合抗原受体。本发明亦关于编码所述CAR的多核苷酸、载体及在其表面表达该CAR的分离的细胞。本发明亦关于改造在其表面表达4G7-CAR的免疫细胞而赋予经转导的细胞延长的“活化”状态的方法。本发明尤其可用于治疗B-细胞淋巴瘤及白血病。

[0003] 发明背景

[0004] 涉及活体外产生的自体抗原特异性T细胞的转移的过继性免疫治疗(adoptive immunotherapy)为治疗病毒感染及癌症的有前景的方法。用于过继性免疫治疗的T细胞可通过经由基因改造扩增抗原特异性T细胞或再导T细胞生成(Park, Rosenberg等人2011)。病毒抗原特异性T细胞的转移为用于治疗移植相关病毒感染及与罕见病毒相关的恶性病的良好确立的程序。类似地,已证实肿瘤特异性T细胞的分离及转移可成功地治疗黑素瘤。

[0005] 已成功地经由转基因T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)的基因转移获得T细胞中的新颖特异性(Jena, Dotti等人2010)。CAR为合成受体,其由与单一融合分子中的一或多个信号传导结构域相关联的靶向部分组成。一般而言,CAR的结合部分由单链抗体(scFv)的抗原结合结构域组成,该单链抗体(scFv)的抗原结合结构域包含单克隆抗体的经弹性接头接合的轻且可变片段。亦已成功地使用基于受体或配体结构域的结合部分。第一代CAR的信号传导结构域衍生自CD3 ζ 的细胞质区域或Fc受体 γ 链。已证实第一代CAR可成功地再导T细胞细胞毒性,然而,其无法提供活体内长时间扩增及抗肿瘤活性。来自包括CD28、OX-40(CD134)、及4-1BB(CD137)的共刺激分子的信号传导结构域经单独(第二代)或组合(第三代)添加以提高CAR改造的T细胞的存活率并增加CAR改造的T细胞的增殖。CAR已成功地容许将T细胞再导成针对在来自包括淋巴瘤及实体瘤的多种恶性病的肿瘤细胞的表面处表达的抗原(Jena, Dotti等人2010)。

[0006] CD19为用于免疫治疗的吸引人的标靶,因大部分B-急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)一致表达CD19,而于非造血细胞、及骨髓、红血球、及T细胞、及骨髓干细胞上不存在表达。对B-细胞恶性病的靶向CD19的临床试验以鼓舞人的抗肿瘤反应进行。大多数融合经基因改造以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞与源自CD19-特异性小鼠单克隆抗体FMC63的scFv区的特异性(Nicholson, Lenton等人1997; Cooper, Topp等人2003; Cooper, Jena等人2012)(国际申请:W02013/126712)。然而,仍需要改良CAR的建构,其显示与T-细胞增殖更好的兼容性,以使表达所述CAR的细胞达成显著临床优点。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明者已生成包含衍生自CD19特异性单克隆抗体(4G7)的scFV的CD19特异性CAR(4G7-CAR),并惊人地发现将所得4G7-CAR引入至原代T细胞中可不依赖于抗原结合地赋予经转导的细胞的延长的“活化”状态。于活体外非特异性活化(例如,利用经抗CD3/CD28涂覆的珠粒及重组IL2)之后,所述细胞相较于经包含FMC63scFV的类似CAR转导的细胞展现出增加的细胞尺寸(芽细胞(blast)形成)以及活化标记物(CD25)在延长时间期内的表达。该长时间活化容许延长的增殖且提供活体外扩增4G7-CAR细胞的不依赖于抗原的机制。

[0009] 本发明因此提供嵌合抗原受体,其包含至少一种胞外配体结合结构域、跨膜结构域及至少一个信号转导结构域,其中所述胞外配体结合结构域包含衍生自特异性单克隆抗体4G7的scFV。特定言之,本发明的CAR一旦转导至免疫细胞中造成该细胞的不依赖于抗原的活化及增殖。本发明亦关于编码包含衍生自CD19特异性单克隆抗体4G7的scFV的CAR的核酸、载体及改造免疫细胞的方法,该方法包括将4G7CAR引入细胞中。本发明亦关于在其表面表达4G7的经基因改造的免疫细胞,特别是不依赖于抗原机制增殖的免疫细胞。本发明的经基因改造的免疫细胞尤其适用于诸如B-细胞淋巴瘤或白血病治疗的治疗性应用。

[0010] 附图简述

[0011] 图1:与未经转导KO T细胞(NTD)相比,用4G7-CAR慢病毒载体转导的TCR α 非活化T细胞(KO)的增殖。在利用可溶性抗-CD28再活化的步骤(IL2+CD28)或没有再活化(IL2)之后的30天期间跟踪增殖。

[0012] 图2:在经4G7-CAR慢病毒载体转导的非活化TCR α T细胞的表面上的CD25活化标记物表达分析,基于4G7-CAR表达(CAR+、CAR-)门控且与TCR α 阳性未经电穿孔(NEP)或经TCR α 破坏但未经转导(NTD)的细胞相比。在利用可溶性抗-CD28再活化的步骤(IL2+CD28)或没有再活化(IL2)之后,分析CD25表达。

[0013] 图3:在用编码4G7-CAR或FMC63-CAR中任一者的慢病毒载体转导的T细胞的表面处的CAR表达分析。该分析在转导后第3、第8及第15天通过流式细胞仪进行。NT指没有经转导的T细胞。

[0014] 图4:在用编码4G7-CAR或FMC63-CAR中任一者的慢病毒载体转导的T细胞的表面处的CD25表达分析。该分析在转导后第3、第8及第15天通过流式细胞仪进行。NT指没有经转导的T细胞。

[0015] 图5:用编码4G7-CAR或FMC63-CAR中任一者的慢病毒载体转导的T细胞的尺寸分析。该分析在转导后第3、第8及第15天通过流式细胞仪进行。NT指没有经转导的T细胞。

[0016] 图6:相较于FMC63慢病毒载体,用4G7-CAR转导的T细胞的增殖。在利用可溶性抗-CD28再活化的步骤(CD28)或没有再活化(-)之后的20天期间跟踪增殖。NTD指没有经转导的T细胞。

[0017] 发明详述

[0018] 除非本文中明确地定义,否则使用的所有技术及科学术语具有与为熟习基因治疗、生物化学、遗传学、及分子生物学领域技术者通常所理解相同的含义。

[0019] 类似或等同于本文所述的所有方法及材料可并与述于本文中的适宜方法及材料用于本发明的实施或测试中。本文中述及的所有公开案、专利申请、专利、及其他参考文献以其全文引用的方式并入。万一冲突,将以本说明书(包括定义)为准。此外,除非另作指明,否则材料、方法、及实例仅说明性而非意图具限制性。

[0020] 除非另作指明,否则本发明的实施将利用于本技术中的习知的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA、及免疫学技术。所述技术完整说明于文献中。参见:例如,Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M.AUSUBEL, 2000,Wiley and son Inc,Library of Congress,USA);Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版(Sambrook等人,2001,纽约冷泉港(Cold Spring Harbor):冷泉港实验室出版社);Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait编辑,1984);Mullis等人美国专利第4,683,195号;Nucleic Acid Hybridization (B.D.Harries及S.J.Higgins编辑1984);Transcription And Translation (B.D.Hames及S.J.Higgins编辑1984);Culture Of Animal Cells (R.I.Freshney、Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning (1984);the series,Methods In ENZYMOLOGY (J.Abelson及M.Simon主编辑,Academic Press,Inc.,纽约),具体言之,第154及155卷(Wu等人编辑)及第185卷,“Gene Expression Technology” (D.Goeddel编辑);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H.Miller与M.P.Calos编辑,1987,冷泉港实验室);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer及Walker编辑,Academic Press,伦敦,1987);Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷 (D.M.Weir及C.C.Blackwell编辑,1986);及 Manipulating the Mouse Embryo (冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港,1986)。

[0021] CD19特异性嵌合抗原受体

[0022] 本发明关于嵌合抗原受体(CAR),其包含胞外配体结合结构域、跨膜结构域及信号转导结构域。

[0023] 如本文所用,术语“胞外配体结合结构域”定义为能够与配体结合的寡肽或多肽。优选地,该结构域将能够与细胞表面分子相互作用。例如,胞外配体结合结构域可经选择以识别充作与特定疾病状态相关联的标靶细胞上的细胞表面标记物的配体。

[0024] 于优选实施方式中,该胞外配体结合结构域包括包含标靶抗原特异性单克隆抗体的经弹性接头接合的轻(V_L)及重(V_H)可变片段的单链抗体片段(scFv)。于优选实施方式中,该scFV衍生自CD19单克隆抗体4G7 (Peipp,Saul等人2004),优选地,本发明的该scFV包含CD19单克隆抗体4G7免疫球蛋白 γ 1重链的一部分 (GenBank:CAD88275.1;SEQ ID NO:1)及CD19单克隆抗体4G7免疫球蛋白 κ 轻链的一部分 (GenBank:CAD88204.1;SEQ ID NO:2),其优选经弹性接头连接在一起。于优选实施方式中,本发明的该scFV包含经弹性接头连接在一起的CD19单克隆抗体4G7免疫球蛋白 γ 1重链的可变片段 (SEQ ID NO:3)及CD19单克隆抗体4G7免疫球蛋白 κ 轻链的可变片段 (SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)。于特定实施方式中,该弹性接头具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)。

[0025] 换言之,该CAR包含包含衍生自CD19特异性单克隆抗体4G7的单链FV片段的胞外配体结合结构域。于特定实施方式中,该scFV包含选自由:SEQ ID NO:1至5组成的组的氨基酸序列的一部分。于优选的实施方式中,该scFV包含与选自由SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8组成的组的氨基酸序列具有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性。

[0026] 根据本发明的CAR的信号转导结构域或胞内信号传导结构域是在胞外配体结合结构域与标靶结合导致免疫细胞的活化及免疫反应后的胞内信号传导的原因。换言之,信号

转导结构域是其中表达CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的活化的原因。例如，T细胞的效应子功能可以是溶细胞活性或辅助活性（包括细胞因子的分泌）。因此，术语“信号转导结构域”指蛋白质的转导效应子信号功能信号及将细胞导向执行特化功能的一部分。

[0027] 用于CAR中的信号转导结构域的优选实例可为T细胞受体及于抗原受体接合后协调作用以起始信号转导的共受体的细胞质序列、及具有相同功能能力的所述序列的任何衍生物或变体及任何合成序列。信号转导结构域包含两种不同类别的细胞质信号传导序列，那些起始不依赖于抗原的一级活化的序列、及那些可以不依赖于抗原方式起作用以提供二级或共刺激信号的序列。一级细胞质信号传导序列可包含称为ITAM的基于免疫受体酪氨酸的活化基序的信号传导基序。ITAM为于充当syk/zap70类别酪氨酸激酶的结合位点的各种受体的细胞质内尾中发现的经明确定义的信号传导基序。用于本发明中的ITAM的实例可呈非限制性实例地包括衍生自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d的其。于一个优选的实施方式中，CAR的信号转导结构域可包括CD3 ζ 信号传导结构域，其具有具有相对选自由（SEQ ID NO:10）组成的组的氨基酸序列至少70%，优选至少80%，更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0028] 于特定实施方式中，本发明的CAR的信号转导结构域包括共刺激信号分子。共刺激分子为有效免疫反应所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。“共刺激配体”指抗原呈递细胞上的与T-细胞上的同族共刺激分子特异性结合分子，因而提供除了由例如使TCR/CD3复合物与负载肽的MHC分子结合所提供的一级信号以外的信号，该信号介导包括（但不限于）增殖活化、分化等的T细胞应答。共刺激配体可包括（但不限于）CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导共刺激配体（ICOS-L）、细胞间黏着分子（ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、与Toll配体受体结合的激动剂或抗体及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体亦尤其涵盖与存于T细胞上的共刺激分子特异性结合的抗体，诸如（但不限于）CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、与淋巴细胞功能相关联的抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体。

[0029] “共刺激分子”指于T-细胞上的与共刺激配体特异性结合，因而通过该细胞介导诸如（但不限于）增殖的共刺激应答的同族结合伴侣。共刺激分子包括（但不限于）MHC I类分子、BTLA及Toll配体受体。共刺激分子的实例包括CD27、CD28、CD8、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、与淋巴细胞功能相关联的抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及与CD83特异性结合的配体等。

[0030] 于优选实施方式中，本发明的CAR的信号转导结构域包含选自由4-1BB（GenBank: AAA53133）及CD28（NP_006130.1）的片段组成的组的共刺激信号分子的一部分。特定言之，本发明的CAR的信号转导结构域包含包含与选自由SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12组成的组的氨基酸序列具有至少70%，优选至少80%，更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0031] 根据本发明的CAR于细胞的表面膜上表达。因此，CAR可包含跨膜结构域。适宜的跨膜结构域的区别特征包括在细胞，于本发明中优选免疫细胞，特定言之淋巴细胞或天然杀伤（NK）细胞的表面处表达，且一起相互作用以导向免疫细胞针对预定靶细胞的细胞应答的能力。跨膜结构域可源自天然或合成来源。跨膜结构域可源自任何膜结合或跨膜蛋白质。

作为非限制性实例,跨膜多肽可为T细胞受体的亚单位(诸如 α 、 β 、 γ 或 δ)、构成CD3复合物、IL2受体p55(α 链)、p75(β 链)或 γ 链、Fc受体(特定言之Fc γ 受体III)的亚单位链或CD蛋白质的多肽。备选地,跨膜结构域可以是合成的及可以主要包含疏水性残基,诸如亮氨酸及缬氨酸。于优选实施方式中,该跨膜结构域衍生自人CD8 α 链(例如NP_001139345.1)。跨膜结构域可进一步包含介于该胞外配体结合结构域与该跨膜结构域之间的茎部区。本文中使用的术语“茎部区”一般意指功能是将跨膜结构域连接至胞外配体结合结构域的任何寡肽或多肽。特定言之,茎部区用于为胞外配体结合结构域提供更多弹性及可及性。茎部区可包含多达300个氨基酸,优选10至100个氨基酸及最优选25至50个氨基酸。茎部区可衍生自天然存在的分子的全部或部分,诸如,衍生自CD8、CD4或CD28的胞外区的全部或部分,或衍生自抗体恒定区的全部或部分。备选地,茎部区可为相当于天然存在的茎部序列的合成序列,或可为整个合成的茎部序列。于优选实施方式中,该茎部区为人CD8 α 链的一部分(例如NP_001139345.1)(SEQ ID NO:196)。于另一个特定实施方式中,所述跨膜及铰链结构域包含人CD8 α 链的一部分,优选地,其包含与选自SEQ ID NO:13组成的组的氨基酸序列具有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性。

[0032] 于特定实施方式中,本发明的该嵌合抗原受体包含衍生自CD19单克隆抗体4G7的scFV,CD8 α 人铰链及跨膜结构域、CD3 ζ 信号传导结构域及4-1BB信号传导结构域。优选地,本发明的4G7CAR包含与选自SEQ ID NO:14及15组成的组的氨基酸序列具有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性。

[0033] 通常在癌细胞中观察到标靶抗原的下调或突变,从而产生抗原损失逃逸变体。因此,为抵销肿瘤逃逸且使得免疫细胞对标靶更具特异性,CD19特异性CAR可包含另一种胞外配体结合结构域,以同时地与标靶中的不同元件结合,因此强化免疫细胞活化及功能。于一个实施方式中,胞外配体结合结构域可以串接地置于相同跨膜多肽上,及任选地由接头间隔。于另一个实施方式中,该不同胞外配体结合结构域可置于构成CAR的不同跨膜多肽上。于另一个实施方式中,本发明关于CAR群,其每者包含不同胞外配体结合结构域。于特定实施方式中,本发明关于改造免疫细胞的方法,该方法包括提供免疫细胞及在该细胞的表面处表达CAR群,其每者包含不同胞外配体结合结构域。于另一个特定实施方式中,本发明关于改造免疫细胞的方法,该方法包括提供免疫细胞及将编码多肽的多核苷酸引入该细胞中,所述多肽构成每者包含不同胞外配体结合结构域的CAR群。所谓CAR群意指至少两个、三个、四个、五个、六个或更多个CAR,其每者包含不同胞外配体结合结构域。根据本发明的不同胞外配体结合结构域可优选同时结合标靶中的不同元件,从而强化免疫细胞活化及功能。本发明亦关于分离的免疫细胞,其包含CAR群,所述的CAR群每者包含不同胞外配体结合结构域。

[0034] 多核苷酸、载体:

[0035] 本发明亦关于编码以上所述的根据本发明的CAR的多核苷酸、载体。于优选实施方式中,本发明关于包含核酸序列SEQ ID NO:17的多核苷酸。于优选实施方式中,多核苷酸与选自SEQ ID NO:17组成的组的核酸序列具有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性。

[0036] 多核苷酸可为表达盒或表达载体(例如,用于引入至细菌宿主细胞中的质粒、或用于转染昆虫宿主细胞的病毒载体诸如杆状病毒载体、或用于转染哺乳动物宿主细胞的质粒

或病毒载体诸如慢病毒)。

[0037] 于特定实施方式中,不同核酸序列可包含于一种多核苷酸或载体中,所述多核苷酸或载体包含编码核糖体跳跃序列(skip sequence)的核酸序列(诸如编码2A肽的序列)。经鉴定在微小核糖核酸病毒的口蹄疫病毒亚群中的2A肽使得核糖体从一个密码子"跳跃"至下一个密码子而不会在密码子所编码的两个氨基酸之间形成肽键(参见(Donnelly及Elliott 2001;Atkins,Wills等人2007;Doronina,Wu等人2008))。所谓"密码子"意指于mRNA上(或于DNA分子的有义链上)通过核糖体翻译为一个氨基酸残基的三个核苷酸。因此,当多肽由符合读框的2A寡肽序列间隔时,两个多肽可自mRNA中单一、连续的开放阅读框合成。所述核糖体跳跃机制为本领域中所熟知且已知由几种载体使用用于表达由单一信使RNA所编码的若干蛋白质。

[0038] 为引导跨膜多肽至宿主细胞的分泌路径中,将分泌信号序列(亦称为前导序列、前原序列或前序列)提供于多核苷酸序列或载体序列中。分泌信号序列有效连接至跨膜核酸序列,即,这两个序列结合于正确读框中且经定位以引导新合成的多肽至宿主细胞的分泌路径中。分泌信号序列通常位于编码受关注多肽的核酸序列的5',尽管某些分泌信号序列可位于受关注核酸序列中的其他位置(参见例如Welch等人,美国专利第5,037,743号;Holland等人,美国专利第5,143,830号)。于优选实施方式中,信号肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:18及19。

[0039] 本领域技术人员应认知,由于基因密码的简并性,于这些多核苷酸分子中可能有相当多序列变异。优选地,本发明的核酸序列就在哺乳动物细胞中表达,优选就在人类细胞中表达经密码子优化。密码子优化指在受关注序列中一般在给定物种的高度表达基因中罕见的密码子由一般在该物种的高度表达基因中常见的密码子交换,当密码子交换时,所述密码子编码氨基酸。

[0040] 于优选实施方式中,根据本发明的多核苷酸包含选自:SEQ ID NO:17组成的组的核酸序列。本发明关于包含与选自SEQ ID NO:17组成的组的核酸序列具有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%、95%、97%或99%序列同一性的核酸序列的多核苷酸。

[0041] 改造免疫细胞的方法:

[0042] 于所包含的特定实施方式中,本发明关于制造用于免疫治疗的免疫细胞的方法,该方法包括将根据本发明的CAR引入至所述免疫细胞中及扩增所述细胞。于特定实施方式中,本发明关于改造免疫细胞的方法,该方法包括提供细胞及在所述细胞的表面处表达至少一个如上所述的CAR。于特定实施方式中,该方法包括利用至少一种编码如上所述的CAR的多核苷酸转化细胞,及表达所述多核苷酸至所述细胞中。

[0043] 于优选实施方式中,有鉴于稳定地表达于细胞中,将所述多核苷酸包含于慢病毒载体中。

[0044] 于另一个实施方式中,该方法进一步包括通过失活至少一个表达TCR的一种组分的基因、免疫抑制剂的标靶、HLA基因及/或诸如PDCD1或CTLA-4的免疫检查点基因,来基因改造该细胞的步骤。于优选实施方式中,该基因选自TCR α 、TCR β 、CD52、GR、PD1及CTLA-4组成的组。于优选实施方式中,该方法进一步包括将能够选择性地通过DNA裂解所述基因而失活的罕见切割核酸内切酶引入至所述T细胞中。于更优选实施方式中,该罕见切割核酸内切酶为TALE-核酸酶或Cas9核酸内切酶。

[0045] 递送方法

[0046] 上述不同方法涉及引入CAR至细胞中。作为非限制性实例,该CAR可作为由一种质粒载体编码的转基因引入。该质粒载体亦可包含提供识别及/或选择接收该载体的细胞的选择标记物。

[0047] 因引入编码所述多肽的多核苷酸至细胞中而可于细胞中在原位合成多肽。备选地,所述多肽可在细胞外产生且接着引入其中。于本领域中已知用于引入多核苷酸构建体至细胞中的方法及作为非限制性实例地包括其中多核苷酸构建体整合至细胞的基因组中的稳定转化方法、其中多核苷酸构建体不整合至细胞的基因组中的瞬时转化方法及病毒介导的方法。所述多核苷酸可通过(例如)重组病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等引入至细胞中。例如,瞬时转化方法包括(例如)微注射、电穿孔或颗粒轰击。有鉴于在细胞中被表达,所述多核苷酸可包含于载体,更特定言之质粒或病毒中。

[0048] 经改造的免疫细胞

[0049] 本发明亦关于容易通过该方法获得以改造细胞的分离的细胞或细胞系。特定言之,该分离的细胞包含至少一种上述CAR。于另一个实施方式中,该分离的细胞包含每者包含不同胞外配体结合结构域的CAR群。特定言之,该分离的细胞包含编码CAR的外源多核苷酸序列。本发明的经基因改造的免疫细胞不依赖于抗原结合机制地被活化及增殖。

[0050] 于本发明的范畴中亦包含分离的免疫细胞,优选依照任何一种上述方法获得的T-细胞。该免疫细胞指功能上参与先天及/或适应性免疫反应的引发及/或执行的造血源细胞。根据本发明的该免疫细胞可衍生自干细胞。所述干细胞可为成人干细胞、非人胚胎性干细胞,更特定言之非人干细胞、脐带血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导的多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。代表性人类细胞为CD34+细胞。该分离的细胞亦可为树突细胞、杀手树突细胞、肥大细胞、NK-细胞、B-细胞或选自由炎性T-淋巴细胞、细胞毒性T-淋巴细胞、调节型T-淋巴细胞或辅助型T-淋巴细胞组成的组的T-细胞。于另一个实施方式中,该细胞可衍生自由CD4+T-淋巴细胞及CD8+T-淋巴细胞组成的组。在本发明的细胞的扩增及基因改造之前,细胞的来源可经由多种非限制性方法获自对象。细胞可获自许多种非限制性来源,包括外周血液单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自注射部位的组织、腹水、胸腔积液、脾脏组织及肿瘤。于本发明的某些实施方式中,可使用可取得且为本领域技术人员已知的任何数目的T细胞系。于另一个实施方式中,该细胞可源生自健康供给者、经诊断罹患癌症的患者或经诊断为感染的患者。于另一个实施方式中,该细胞为呈现不同表型特征的混合细胞群体的一部分。于本发明的范畴中亦包含依照上述方法自经转化的T-细胞获得的细胞系。对免疫抑制治疗有抗性且容易通过上述方法获得的经改造的细胞包含于本发明的范畴中。

[0051] 于另一个实施方式中,根据本发明的该分离的细胞包含编码CAR的多核苷酸。

[0052] T细胞的活化及扩增

[0053] 无论在T细胞的基因改造之前或之后,即使本发明的经基因改造的免疫细胞不依赖于抗原结合机制地被活化及增殖,免疫细胞,特定言之本发明的T-细胞亦可进一步一般地利用如例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;及美国专利申请公开第20060121005号中所述的方法来活

化及扩增。T细胞可在活体外或在活体内扩增。

[0054] 一般而言,本发明的T细胞通过在T细胞的表面上与刺激CD3TCR复合物的活性剂及共刺激分子接触以产生T-细胞的活化信号来扩增。

[0055] 例如,诸如钙离子载体A23187、佛波醇12-肉豆蔻酸13-乙酸酯(PMA)、或例如植物血球凝集素(PHA)的有丝分裂凝集素的化学品可用于产生T-细胞的活化信号。

[0056] 作为非限制性实例,T细胞群体可在活体外刺激,诸如通过与抗-CD3抗体、或其抗原结合片段、或固定于表面上的抗-CD2抗体接触,或通过通过蛋白激酶C活化剂(例如,苔藓虫素)连同钙离子载体接触。对于T细胞的表面上的辅助分子的共刺激,使用与辅助分子结合的配体。例如,T细胞群可在适宜刺激T细胞的增殖的条件下与抗-CD3抗体及抗-CD28抗体接触。适宜用于T细胞培养物的条件包括可包含增殖及存活时所需因子的适宜培养基(例如,最低必须培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 5(Lonza)),包括血清(例如,胎牛或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN-g、1L-4、1L-7、GM-CSF、-10、-2、1L-15、TGFp、及TNF-或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括(但不限于)表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)、及诸如N-乙酰基-半胱氨酸及2-巯基乙醇的还原剂。培养基可包括具有添加的氨基酸、丙酮酸钠、及维生素的无血清或补充适宜量的血清(或血浆)或定义的组的激素、及/或足以生长且扩增T细胞的量的细胞因子的RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 1、及X-Vivo 20(Optimizer)。例如青霉素及链霉素的抗生素仅包含于实验培养基中,而非包含于意欲注入至对象中的细胞的培养物中。靶细胞维持于支持生长需要的条件,例如适宜温度(例如,37°C)及氛围(例如,空气加上5%CO₂)。已暴露于不同刺激多次的T细胞可展现不同特征。

[0057] 于另一个特定实施方式中,所述细胞可通过与组织或细胞共培养来扩增。所述细胞亦可在活体内扩增,例如于将所述细胞施用至对象中后在对象血液中扩增。

[0058] 治疗应用

[0059] 于另一个实施方式中,可使用通过不同方法获得的分离的细胞或衍生自该上述分离的细胞的细胞系作为药物。于另一个实施方式中,该药物可用于治疗有需要的患者的癌症,特定言之用于治疗有需要的患者的B-细胞淋巴瘤及白血病。于另一个实施方式中,根据本发明的该分离的细胞或衍生自该分离的细胞的细胞系可用于制造用于治疗有需要的患者的癌症的药物。

[0060] 于另一个方面中,本发明依托于用于治疗有需要的患者的方法,该方法包括以下步骤中的至少一个:

[0061] (a) 提供可通过任何一种上述方法获得的免疫细胞;

[0062] (b) 将所述经转化的免疫细胞施用给所述患者,

[0063] 于一个实施方式中,本发明的所述T细胞可经过稳健的活体内T细胞扩增及可持续一段延长的时间。

[0064] 该治疗可为改善、治愈或预防性的。其可为自体免疫治疗的一部分或同种异源免疫治疗的一部分。所谓自体意指用于治疗患者的细胞、细胞系或细胞群源自该患者或源自人白细胞抗原(HLA)相容的供给者。所谓同种异源意指用于治疗患者的细胞或细胞群不是源自该患者而是源自供给者。

[0065] 于先前章节中描述可以用所揭示方法使用的细胞。该治疗可用于治疗经诊断罹患

癌症的患者。可治疗的癌症可包括非实体肿瘤(诸如血液性肿瘤,包括(但不限于)前-B ALL(小儿适应症)、成人ALL、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B-细胞淋巴瘤等。可通过本发明的CAR治疗的癌症类型包括(但不限于)某些白血病或淋巴恶性病。亦包括成人肿瘤/癌症及儿童肿瘤/癌症。

[0066] 该治疗可为与一或多种选自以下的组的抗癌疗法组合的治疗:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法及辐射疗法。

[0067] 根据本发明的优选的实施方式,该治疗可施用给接受免疫抑制治疗的患者。实际上,本发明优选地依赖于细胞或细胞群,所述细胞或细胞群已因编码对于该免疫抑制剂的受体的基因的失活而产生对至少一种免疫抑制剂抗性。在此方面中,免疫抑制治疗应有助于根据本发明的T-细胞于患者中的选择及扩增。

[0068] 根据本发明的细胞或细胞群的施用可以任何简便方法,包括通过气雾剂吸入、注射、摄取、输注、植入或移植进行。述于本文中的组合物可皮下、皮内、瘤内、节内、髓内、肌肉内、通过静脉内或淋巴内注射、或腹膜内施用给患者。于一个实施方式中,本发明的细胞组合物优选经静脉内注射施用。

[0069] 细胞或细胞群的施用可由施用 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重组成,包括所述范围中的细胞数目的所有整数值。所述细胞或细胞群可以一或多次剂量施用。于另一个实施方式中,细胞的该有效量以单剂量施用。于另一个实施方式中,细胞的该有效量在一段时间期内以多于一次剂量施用。投药的定时在主治医师的判断中且取决于患者的临床病况。细胞或细胞群可获得自诸如血库或供给者的任何来源。虽然个体需求不同,但对于特定疾病或病况的给定细胞类型的有效量最佳范围的确定在本领域的技术中。有效量意指提供治疗或预防效益的量。施用的剂量将取决于接受者的年龄、健康状态及体重、同期治疗(若存在的话)的类型、治疗的频率及所预期效果的本质。

[0070] 于另一个实施方式中,细胞或包含那些细胞的组合物的该有效量为肠胃外施用。该施用可为静脉内施用。该施用可直接地通过注射于肿瘤中进行。

[0071] 于本发明的某些实施方式中,细胞连同(例如,先于、同时或之后)任何数目的相关治疗方式施用给患者,该相关治疗方式包括(但不限于)利用活性剂的治疗,诸如抗病毒治疗、西多福韦(cidofovir)及白介素-2、阿糖胞苷(Cytarabine)(亦称为ARA-C)或用于MS患者的那他珠单抗(natalizumab)治疗或用于银屑病患者依法利珠单抗(efalizumab)治疗或用于PML患者的其他治疗。于其他实施方式中,本发明的T细胞可与化疗、放射、免疫抑制剂(诸如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲胺喋呤、麦考酚酯、及FK506、抗体或诸如CAM PATH的其他免疫消融剂、抗-CD3抗体或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉芬酸(mycophenolic acid)、类固醇、FR901228、细胞因子、及辐射组合使用。这些药物抑制钙离子依赖性磷酸酶钙依赖磷酸酶(calcineurin)(环孢菌素及FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Henderson,Naya等人1991;Liu,Albers等人1992;Bierer,Hollander等人1993)。于其他实施方式中,本发明的细胞组合物连同(例如,先于、同时或之后)骨髓移植、使用化疗剂(诸如氟达拉滨(fludarabine)、体外束放射治疗(XRT)、环磷酰胺)、或抗体(诸如OKT3或CAMPATH)中任一者的T细胞消融疗法施用给患者。于另一个实施方式中,本发明的细胞组合物于B-细胞消融疗法(诸如,与CD20反应的活性剂(例如,美罗华(Rituxan)))之后施用。例如,于一个

实施方式中,对象可经历以高剂量化疗的标准治疗,接着外周血液干细胞移植。于某些实施方式中,于移植后,对象接受输注经扩增的本发明的免疫细胞。于另一个实施方式中,经扩增的细胞在手术之前或之后施用。

具体实施方式

[0072] 1. CD19特异性嵌合抗原受体,其包含至少一个胞外配体结合结构域、跨膜结构域及至少一个胞内信号传导结构域,其中所述胞外结构域包含衍生自CD19特异性的单克隆抗体4G7的 γ 重链(SEQ ID NO:1)及 κ 轻链(SEQ ID NO:2)的单链FV片段。

[0073] 2. 实施方式1的CD19特异性嵌合抗原受体,其中衍生自单克隆抗体4G7的所述单链FV片段包含选自SEQ ID NO:3至5及SEQ ID NO:7至8组成的组的氨基酸序列。

[0074] 3. 实施方式1或2的CD19特异性嵌合抗原受体,其中所述胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 信号传导结构域。

[0075] 4. 根据实施方式1至3中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体,其中所述胞内信号传导结构域包含4-1BB结构域。

[0076] 5. 根据实施方式1至4中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体,其包含人类CD8 α 链跨膜及茎部结构域。

[0077] 6. 根据实施方式1至5中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:14及15具有至少75%,优选80%、85%、90%、95%的氨基酸序列。

[0078] 7. 根据实施方式1至6中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体,其还包含另一非CD19特异性的胞外配体结合结构域。

[0079] 8. 编码根据实施方式1至7中任一项的所述嵌合抗原受体的多核苷酸。

[0080] 9. 实施方式8的多核苷酸,其包含与核酸序列SEQ ID NO:17具有至少75%,优选80%、85%、90%、95%的核酸序列。

[0081] 10. 包含实施方式8或9的核酸的表达载体。

[0082] 11. 基因改造的免疫细胞,其在细胞表面膜表达CD19特异性嵌合抗原受体,该CD19特异性嵌合抗原受体包含至少一个胞外配体结合结构域及至少一个胞内信号传导结构域,其中所述胞外结构域包含衍生自CD19特异性的单克隆抗体4G7的单链FV片段。

[0083] 12. 基因改造的免疫细胞,其在细胞表面膜表达根据实施方式1至7中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体。

[0084] 13. 实施方式11或12的基因改造的免疫细胞,其还包含另一种非CD19特异性的嵌合抗原受体。

[0085] 14. 根据实施方式11至13中任一项的基因改造的免疫细胞,其衍生自炎性T-淋巴细胞、细胞毒性T-淋巴细胞、调节型T-淋巴细胞或辅助型T-淋巴细胞。

[0086] 15. 基因改造的免疫细胞,其自供给者回收。

[0087] 16. 基因改造的免疫细胞,其自患者回收。

[0088] 17. 基因改造的细胞,其用于治疗。

[0089] 18. 基因改造的细胞,其用于B-细胞淋巴瘤或白血病。

[0090] 19. 改造免疫细胞的方法,其包括:

[0091] (a) 提供免疫细胞,

[0092] (b) 在所述细胞的表面表达至少一种根据实施方式1至7中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体。

[0093] 20. 实施方式19的改造免疫细胞的方法,其包括:

[0094] (a) 提供免疫细胞,

[0095] (b) 将编码所述CD19特异性嵌合抗原受体的至少一种多核苷酸引入所述细胞中,

[0096] (c) 表达所述多核苷酸至所述细胞中。

[0097] 21. 实施方式19的改造免疫细胞的方法,其包括:

[0098] (a) 提供免疫细胞,

[0099] (b) 将编码所述CD19特异性嵌合抗原受体的至少一种多核苷酸引入所述细胞中,

[0100] (c) 引入至少一种非CD19特异性的其他嵌合抗原受体。

[0101] 22. 治疗有需要对象的方法,其包括:

[0102] (a) 提供在表面表达根据实施方式1至7中任一项的CD19特异性嵌合抗原受体的免疫细胞;

[0103] (b) 将所述免疫细胞施用给所述患者。

[0104] 其他定义

[0105] -除非另作指明,否则“a”、“an”、“the”及“至少一种”可互换使用及意指一种或多种。-多肽序列中的氨基酸残基在本文中依照一字母代码命名,其中,例如,Q意指Gln或谷氨酰胺残基,R意指Arg或精氨酸残基及D意指Asp或天冬氨酸残基。

[0106] -氨基酸取代意指一个氨基酸残基由另一个氨基酸残基代换,例如,肽序列中精氨酸残基由谷氨酰胺残基代换为氨基酸取代。

[0107] -核苷酸如下命名:一字母代码用于命名核苷的碱基:a为腺嘌呤,t为胸腺嘧啶,c为胞嘧啶,及g为鸟嘌呤。用于简并的核苷酸,r表示g或a(嘌呤核苷酸),k表示g或t,s表示g或c,w表示a或t,m表示a或c,y表示t或c(嘧啶核苷酸),d表示g、a或t,v表示g、a或c,b表示g、t或c,h表示a、t或c,及n表示g、a、t或c。

[0108] -如本文所用,“核酸”或“多核苷酸”指核苷酸及/或多核苷酸,诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、经聚合酶链反应(PCR)生成的片段、及通过连接、切断、核酸内切酶作用、及核酸外切酶作用中任何一种生成的片段。核酸分子可由为天然存在的核苷酸(诸如DNA及RNA)的单体、或天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的对映异构形式)、或两者的组合组成。经修饰的核苷酸可具有在糖部分及/或在嘧啶或嘌呤碱基部分中的改变。糖修饰包括(例如)一或多个羟基由卤素、烷基、胺、及迭氮基代换,或糖可经官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可由空间及电上类似的结构(诸如氮杂糖及碳环糖类似物)置换。于碱基部分中的修饰的实例包括烷基化的嘌呤及嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶、或其他所熟知的杂环取代基。核酸单体可经磷酸二酯键或此类连接的类似物连接。核酸可为单链或双链。

[0109] -所谓嵌合抗原受体(CAR)为将针对存于标靶细胞上的组分(例如,对于所期抗原(例如,肿瘤抗原)的基于抗体的特异性)的结合结构域与T细胞受体活化胞内结构域组合以生成展现特异性抗标靶细胞免疫活性的嵌合蛋白质的预期分子。一般而言,CAR由融合至T细胞抗原受体复合物 ζ 链(scFvFc: ζ)的胞内信号传导结构域的胞外单链抗体(scFvFc)组成且具有在T细胞中表达时能基于单克隆抗体的特异性再导抗原识别的能力。用于本发明中

的CAR的一个实例为导向抗CD19抗原的CAR及可作为非限制性实例地包含氨基酸序列:SEQ ID NO:14。

[0110] -术语“核酸内切酶”指能催化介于DNA或RNA分子,优选DNA分子中核酸之间的键的水解(裂解)的任何野生型或变体酶。核酸内切酶在不考虑其序列下并不切割DNA或RNA分子,但可识别并切割在另外被称为“标靶序列”或“标靶位点”的特异性多核苷酸序列处的DNA或RNA分子。核酸内切酶在通常具有多于12个碱基对(bp)长度,更优选14至55个bp长度的多核苷酸识别位点时可被归类为罕见切割核酸内切酶。罕见切割核酸内切酶通过在确定的基因座诱导DNA双链断裂(DSB)而显著地增加HR(Perrin,Buckle等人1993;Rouet,Smih等人1994;Choulika,Perrin等人1995;Pingoud及Silva 2007)。罕见切割核酸内切酶可例如为归巢核酸内切酶(Paques及Duchateau 2007)、自使经改造的锌指结构域与限制酶(诸如FokI)的催化结构域融合所得的嵌合锌指核酸酶(ZFN)(Porteusy及Carrot)2005)、来自CRISPR系统的Cas9核酸内切酶(Gasiunas,Barrangou等人2012;Jinek,Chylinski等人2012;Cong,Ran等人2013;Mali,Yang等人2013)或化学核酸内切酶(Eisenschmidt,Lanio等人2005;Arimondo,Thomas等人2006)。于化学核酸内切酶中,化学或肽切割者缀合至核酸的聚合物或至另一种识别特异性标靶序列的DNA,从而将切割活性靶向至特异性序列。化学核酸内切酶亦包含合成的核酸酶,例如,邻二氮菲、DNA切割分子、及已知与特异性DNA序列结合的形成三螺旋的寡核苷酸(TFO)的缀合物(Kalish及Glazer 2005)。此类化学核酸内切酶包含于根据本发明的术语“核酸内切酶”中。

[0111] -“TALE-核酸酶”(TALEN)意为由通常衍生自转录活化因子样效应因子(TALE)的核酸结合结构域及一个切割核酸标靶序列的核酸酶催化结构域组成的融合蛋白质。催化结构域优选为核酸酶结构域及更优选为具有核酸内切酶活性的结构域,诸如I-TevI、CoIE7、NucA及Fok-I。于特定实施方式中,TALE结构域可融合至大范围核酸酶诸如例如I-CreI及I-OnuI或其功能性变体。于更优选的实施方式中,该核酸酶为单体TALE-核酸酶。单体TALE-核酸酶为特异性识别及切割不需要二聚化的TALE-核酸酶,诸如,述于W02012138927中的经改造的TAL重复与I-TevI的催化结构域的融合。转录激活因子样效应因子(TALE)为来自细菌物种黄单孢菌属(Xanthomonas)的蛋白质,包含复数种重复的序列,各重复包含对被核酸靶向的序列的各个核苷酸碱基具特异性的在位置12及13中的二残基(RVD)。具有类似的模块碱基-碱基核酸结合性质的结合结构域(MBBBD)亦可衍生自最近由申请人在不同细菌物种中发现的新颖模块蛋白质。所述新颖模块蛋白质具有展现较TAL重复更大的序列可变性的优点。优选地,与不同核苷酸的识别相关联的RVD为用于识别C的HD、用于识别T的NG、用于识别A的NI、用于识别G或A的NN、用于识别A、C、G或T的NS、用于识别T的HG、用于识别T的IG、用于识别G的NK、用于识别C的HA、用于识别C的ND、用于识别C的HI、用于识别G的HN、用于识别G的NA、用于识别G或A的SN或及用于识别T的YG、用于识别A的TL、用于识别A或G的VT及用于识别A的SW。于另一个实施方式中,关键氨基酸12及13可突变为其他氨基酸残基以调节其针对于核苷酸A、T、C及G的特异性及特定言之以增进该特异性。已经描述及使用TALE-核酸酶以刺激基因靶向及基因修饰(Both,Scholze等人2009;Moscou及Bogdanove 2009;Christian,Cermak等人2010;Li,Huang等人2011)。经改造的TAL-核酸酶可以商标TALEN™(Collectis,8rue de la Croix Jarry,75013法国巴黎)商购。

[0112] 根据本发明的罕见切割核酸内切酶亦可为Cas9核酸内切酶。最近,已基于来自II

型原核CRISPR (成簇有规律间隔短回文重复序列) 适应性免疫系统 (综述请参见 (Sorek, Lawrence等人2013)) 的RNA导向Cas9核酸酶开发出新颖基因组改造工具 (Gasiunas, Barrangou等人2012; Jinek, Chylinski等人2012; Cong, Ran等人2013; Mali, Yang等人2013)。CRISPR相关 (Cas) 系统最先在细菌中发现且用作防御外来DNA (病毒或质粒)。CRISPR介导的基因组改造最先通过选择通常侧接短序列基序 (称为原间隔序列 (proto-spacer) 相邻基序 (PAM)) 的靶序列进行。于靶序列选择之后, 改造与该靶序列互补的特异性 crRNA。CRISPR II型系统中所需要的顺式活化 crRNA (tracrRNA) 与 crRNA 配对并结合至所提供的 Cas9 蛋白质。Cas9 用作促使 tracrRNA 与 crRNA 碱基配对的分子锚 (Deltcheva, Chylinski 等人2011)。于该三元复合物中, 双重 tracrRNA: crRNA 结构用作引导核酸内切酶 Cas9 至同族靶序列的导向 RNA。Cas9-tracrRNA: crRNA 复合物识别靶序列通过就靶序列与 crRNA 间的同源性扫描靶序列而起始。除了靶序列-crRNA 互补性外, DNA 靶向需要存在与原间隔序列相邻的短基序 (原间隔序列相邻基序-PAM)。于双重-RNA 及靶序列之间配对的后, Cas9 于随后在 PAM 基序上游 3 碱基处引入平齐双链断裂 (Garneau, Dupuis 等人2010)。

[0113] 罕见切割核酸内切酶可为归巢核酸内切酶, 其亦称为大范围核酸酶 (meganuclease)。此领域中熟知此类归巢核酸内切酶 (Stoddard 2005)。归巢核酸内切酶识别 DNA 靶序列且产生单或双链断裂。归巢核酸内切酶具高度特异性, 可识别范围自 12 至 45 个碱基对 (bp) 长度, 通常范围自 14 至 40 个 bp 长度的 DNA 靶位点。根据本发明的归巢核酸内切酶可对应于例如 LAGLIDADG 核酸内切酶、HNH 核酸内切酶、或 GIY-YIG 核酸内切酶。根据本发明的优选归巢核酸内切酶可为 I-Cre1 变体。

[0114] -“递送载体”意指可用于本发明中以使得细胞接触 (换言之, “接触”) 或于细胞或亚细胞隔室内递送 (换言之, “引入”) 本发明中需要的活性剂/化学品及分子 (蛋白质或核酸) 的任何递送载体。其包括 (但不限于) 脂质体递送载体、病毒递送载体、药物递送载体、化学品载体、聚合物载体、脂复合体、聚合复合体、树枝状聚合物、微泡体 (超音波造影剂)、纳米颗粒、乳液或其他适宜转移载体。这些递送载体允许递送分子、化学品、大分子 (基因、蛋白质)、或其他载体诸如由 Diatos 开发的质体、肽。于这些情况中, 递送载体为分子载体。“递送载体”亦意指可进行转染的递送方法。

[0115] -术语“载体”指可输送其所连接的另一种核酸的核酸分子。本发明中的“载体”包括 (但不限于) 病毒载体、质粒、RNA 载体或可由染色体、非染色体、半合成或合成核酸组成的线性或环状 DNA 或 RNA 分子。优选的载体为那些可自主复制者 (附加型载体) 及/或可表达其所连接的核酸者 (表达载体)。大量适宜载体为本领域技术人员已知且可商购。

[0116] 病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、小病毒 (例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链 RNA 病毒, 诸如正黏液病毒 (例如, 流行性感病毒) 的、杆状病毒 (例如, 狂犬病毒及水泡性口炎病毒)、副黏液病毒 (例如麻疹及仙台病毒)、正链 RNA 病毒, 诸如小核糖核酸病毒及阿尔法病毒 (alphavirus)、及双链 DNA 病毒, 其包括腺病毒、疱疹病毒 (例如, 单纯疱疹病毒 1 型及 2 型、Epstein-Barr 病毒、巨大细胞病毒)、及痘病毒 (例如, 牛痘、禽痘及金丝雀痘)。其他病毒包括 (例如) 诺瓦克 (Norwalk) 病毒、外衣病毒 (togavirus)、黄病毒、里奥病毒 (reoviruses)、乳多空病毒 (papovavirus)、嗜肝 DNA 病毒 (hepadnavirus)、及肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括: 禽白血病肉瘤病毒、哺乳动物 C-型病毒、B 型病毒、D 型病毒、HTLV-BLV 群、慢病毒、泡沫病毒 (spumavirus) (Coffin, J.M., Retroviridae: The viruses and their replication,

Fundamental Virology, 第3版, B.N.Fields等人编辑, Lippincott-Raven Publishers, 费城, 1996)。

[0117] -“慢病毒载体”意指因其相对大的包装能力、经减低的免疫原性及其稳定高效率地转导大范围的不同细胞类型的能力而用于基因递送极为有前途的基于HIV的慢病毒载体。慢病毒载体通常在瞬时转染三种(包装、包膜及转移)或更多种质粒至产生者细胞中之后产生。像HIV, 慢病毒载体经由病毒表面糖蛋白与细胞表面上的受体相互作用进入靶细胞。在进入时, 病毒RNA经历由病毒逆转录酶复合物介导的逆转录。逆转录的产物为双链线性病毒DNA, 其为使病毒整合于受感染细胞的DNA中的底物。“整合的慢性病毒载体(或LV)”意指作为非限制性实例此类可与靶细胞的基因组整合的载体。相反地, “非整合型慢病毒载体(或NILV)”意指并不经由病毒整合酶的作用与靶细胞的基因组整合的有效基因递送载体。

[0118] -递送载体及载体可与诸如声穿孔或电穿孔或这些技术的衍生法的任何细胞穿透技术的联合或组合。

[0119] -细胞意指衍生自这些用于活体外培养的生物体的任何真核活细胞、原代细胞及细胞系。

[0120] -“原代细胞”意指直接从活组织(即, 活组织检查材料)取得且建立用于活体外生长的细胞, 所述细胞已经历极少群加倍且因此较之持续致癌性或人工永生细胞系更可代表衍生其的组织的主要功能性组分及特征。

[0121] 作为非限制性实例, 细胞系可选自CHO-K1细胞; HEK293细胞; Caco2细胞; U2-OS细胞; NIH 3T3细胞; NSO细胞; SP2细胞; CHO-S细胞; DG44细胞; K-562细胞; U-937细胞; MRC5细胞; IMR90细胞; Jurkat细胞; HepG2细胞; HeLa细胞; HT-1080细胞; HCT-116细胞; Hu-h7细胞; Huvec细胞; Molt 4细胞组成的组。

[0122] 所有这些细胞系可由本发明的方法来修饰以提供产生、表达、量化、检测、研究受关注基因或蛋白质的细胞系模型; 这些模型亦可用于筛选研究及生产及诸如作为非限制性实例的化学、生物燃料、治疗学及农艺学的多种领域结构中受关注的生物活性分子。

[0123] -“突变”意指多核苷酸(cDNA、基因)或多肽序列中多达一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、二十个、二十五个、三十个、四十个、五十个、或更多个核苷酸/氨基酸的取代、缺失、插入。突变会影响基因的编码序列或其调节序列。亦可能会影响基因组序列的结构或编码的mRNA的结构/稳定性。

[0124] -“变体”意指通过亲本分子的氨基酸序列中至少一个残基的突变或代换获得的重复变体、变体、DNA结合变体、TALE-核酸酶变体、多肽变体。

[0125] -“功能性变体”意指蛋白质或蛋白质结构域的催化活性突变体; 该突变体可具有与其亲本蛋白质或蛋白质结构域相同的活性或其他性质、或更高或更低活性。

[0126] -“同一性”指两条核酸分子或多肽之间的序列同一性。同一性可通过比较可基于比较目的而进行比对的各序列中的位置来确定。当所比较的序列中的位置被相同碱基占据时, 则分子在该位置具同一性。核酸或氨基酸序列之间的相似性或同一性的程度是在核酸序列共享位置处的相同或匹配核苷酸的数目的函数。多种比对算法及/或程序可用于计算两条序列之间的同一性, 包括可作为GCG序列分析包装(University of Wisconsin, 威斯康星州麦迪逊)的一部分取得的FASTA或BLAST, 及可以例如预设设置使用。例如, 设想与本文

所述特异性多肽具有至少70%、85%、90%、95%、98%或99%同一性且优选展现实质上相同功能的多肽、及编码此类多肽的多核苷酸。

[0127] -“相似性”描述两条或更多条多肽的氨基酸序列之间的关系。BLASTP亦可用于利用诸如BLOSUM45、BLOSUM62或BLOSUM80的相似矩阵来鉴定与参考氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%序列相似性的氨基酸序列。除非另作指明，否则相似性得分值将基于BLOSUM62的使用。当使用BLASTP时，相似性百分比基于BLASTP正得分及序列同一性百分比基于BLASTP同一性得分。BLASTP“同一性”显示高得分序列对中相同的总碱基数及分数；及BLASTP“正数”显示比对得分具有正值且彼此相似的残基数及分数。本文公开内容设想并涵盖与本文中公开的氨基酸序列具有这些同一性或相似性程度或同一性或相似性的任何中间程度的氨基酸序列。相似多肽的多核苷酸序列利用遗传代码来推导及可通过常规方法来获得。编码此类功能性变体的多核苷酸将通过利用遗传代码逆翻译其氨基酸序列来制造。

[0128] -“信号转导结构域”或“共刺激配体”指与T-细胞上的同族共刺激分子特异性结合的抗原呈递细胞上的分子，因此提供除了由例如使TCR/CD3复合物与负载肽的MHC分子结合所提供的一级信号以外的信号，该信号介导包括(但不限于)增殖活化、分化等的T细胞应答。共刺激配体可包括(但不限于)CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导共刺激配体(ICOS-L)、细胞间黏着分子(ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/TR6、ILT3、ILT4、与To11配体受体结合的激动剂或抗体及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体亦尤其包括与存于T细胞上的共刺激分子特异性结合的抗体，诸如(但不限于)CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关联的抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体。

[0129] “共刺激分子”指于T细胞上的与共刺激配体特异性结合的同族结合伴侣，因此通过细胞介导诸如(但不限于)增殖的共刺激反应。共刺激分子包括(但不限于)MHC I类分子、BTLA及To11配体受体。

[0130] 如本文中所示，“共刺激信号”指与一级信号(诸如TCR/CD3接合)组合导致T细胞增殖及/或关键分子的上调或下调的信号。

[0131] -如本文中所示，术语“胞外配体结合结构域”定义为可与配体结合的寡肽或多肽。优选地，结构域将能够与细胞表面分子相互作用。例如，可选择胞外配体结合结构域以识别充作与特定疾病状态相关联的靶细胞上的细胞表面标记物的配体。因此，可充作配体的细胞表面标记物的实例包括与病毒、细菌及寄生性感染、自体免疫疾病及癌细胞相关联的那些。

[0132] 如本文中所示，术语“对象”或“患者”包括动物界的所有成员，包括非人灵长类及人。

[0133] 本发明的以上书面论述提供制造及使用其的方式及方法，使得本领域任何技术人员能制造及使用相同者，这种可实施性特别地对于随附权利要求书的主题而提供，所述权利要求书构成原始说明书的一部分。

[0134] 在本文陈述数值限值或范围时，端点包含在内。此外，所有值及于数值限值或范围中的子范围具体地包含在内，犹如明确地写出来那样。

[0135] 呈现以上论述以使本领域技术人员可制造及使用本发明，且提供于特定应用及其

要求的上下文中。对优选实施方式的多种修改为本领域技术人员轻易明了,及定义于本文中的一般原理可在不脱离本发明的精神及范畴下应用于其他实施方式及应用。因此,本发明并非意图受到所显示实施方式限制,而应遵循与揭示于本文中的原理及特征一致的最宽广范畴。

[0136] 已大致上描述本发明,可参照某些具体实施例获得进一步的理解,除非另作指明否则所述实施例仅基于说明目的提供于本文中,而非意图限制。

[0137] 实施例

[0138] 实施例1:表达4G7-CAR的TCR α 失活的细胞的增殖。

[0139] 设计并生产靶向T-细胞受体 α 恒定链区(TRAC)基因中的由15-bp间隔子间隔的两条17-bp长序列(称为半标靶)的异二聚TALE-核酸酶。各个半标靶由列于表1中的半TALE-核酸酶的重复识别。

[0140]

标靶	标靶序列	重复序列	半TALE-核酸酶
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATA TCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTG AGA (SEQ ID NO:20)	重 复 TRAC_T01-L (SEQ ID NO:21)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO:23)
		重 复 TRAC_T01-R (SEQ ID NO:22)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO:24)

[0141] 利用限制酶消化在哺乳动物表达载体中在T7启动子的控制下对各TALE-核酸酶构建体进行亚克隆。从携带来自T7启动子下游的编码序列的质粒合成编码TALE-核酸酶切割TRAC基因组序列的mRNA。

[0142] 用编码两种半TRAC_T01TALE-核酸酶的2种mRNA中每者转染在72小时期间用涂覆有抗CD3/CD28的珠粒预活化的纯化的T细胞。转染48小时后,利用编码4G7-CAR(SEQ ID NO:14)的慢病毒载体转导T细胞。转导2天后,使用抗-CD3磁性珠粒纯化CD3^{NEG}细胞,并且转导第5后,利用可溶性抗-CD28(5 μ g/ml)再活化所述细胞。

[0143] 于再活化后通过每周计数细胞2次跟踪细胞增殖长达30天。图1显示对于两种不同的供给者,细胞个数关于在再活化后第2天所存在的细胞量的诱导倍率。在表达4G7-CAR的TCR α 的非活化细胞中,尤其在用抗-CD28再活化时,观察到相较于未经转导的细胞增加的增殖。

[0144] 为研究表达4G7-CAR的人类T细胞是否展现活化的状态,在转导7天后,通过FACS分析活化标记物CD25的表达。如图2中所示,用编码4G7-CAR的慢病毒载体转导的纯化的细胞在其表面比未转导的细胞表达显著更多的CD25。在CD28再活化或没有再活化条件中均观察到增加的CD25表达。

[0145] 实施例2:表达4G7-CAR及经典FMC63-CAR的原代人类T细胞的基底活化的比较。

[0146] 为确定4G7scFV是否赋予经转导的细胞延长的"活化"状态,比较用载有4G7scFV(SEQ ID NO:17编码的SEQ ID NO:15)或经典FMC63scFV(SEQ ID NO:16)的CAR转导的T细胞的基底活化。

[0147] 依照以下方案转导纯化的人类T细胞:简言之,利用编码4G7-CAR(SEQ ID NO:15)

及FMC63-CAR (SEQ ID NO:16)的慢病毒载体以MOI为5于经30 μ g/ml重组retronectin涂覆的12孔非组织培养盘中转导在3天期间利用经抗CD3/CD28涂覆的珠粒及重组IL2预活化的 1×10^6 个CD3+细胞。转导24小时后,移去培养基及改由新鲜培养基代换。细胞接着在整个培养期间通过每2至3天细胞计数维持在 1×10^6 个细胞/ml的浓度。

[0148] 利用编码4G7-CAR或FMC63-CAR的慢病毒载体转导3、8及15天后,通过流式细胞仪评估表达CAR的细胞的百分比。观察到利用两种慢病毒载体,转导的效率相对等效(图3)。

[0149] 接着研究表达4G7-CAR的人类T细胞是否展现比表达FMC63-CAR的人类T细胞更活化的状态。为达该目的,在不同时间点比较用2种慢病毒载体转导的T细胞表面处的活化标记物CD25的表达。如图4中所示,在转导3及8天后,用编码4G7-CAR的慢病毒载体转导的细胞在其表面比用编码FMC63-CAR的慢病毒载体转导的细胞表达显著更多的CD25。

[0150] 亦可通过流式细胞仪在不同时间点评估用4G7-CAR或FMC63-CAR转导的细胞的尺寸。观察到转导3、8及15天后,表达4G7-CAR的细胞比表达FMC63-CAR的细胞更大(图5)。

[0151] 于活体外非特异性活化后,用4G7-CAR转导的细胞展现增加的细胞尺寸(芽细胞形成)及延长的时间期间的活化标记物(CD25)的表达。该长程活化允许相较用包含FMC63ScFv的类似CAR转导的细胞延长的增殖。

[0152] 实例3:表达4G7-CAR及经典FMC63-CAR的原代人类T细胞的增殖间的比较。

[0153] 为确定4G7scFV是否赋予较高的增殖活性,通过每周计数细胞两次跟踪用载有4G7scFV (SEQ ID NO:17编码的SEQ ID NO:15)或经典FMC63scFV (SEQ ID NO:16)的CAR转导的T细胞的增殖长达20天。依照以下方案转导纯化的人类T细胞:简言之,利用编码4G7-CAR (SEQ ID NO:15)及FMC63-CAR (SEQ ID NO:16)的慢病毒载体转导在3天期间利用经抗CD3/CD28涂覆的珠粒及重组IL2预活化的 1×10^6 个CD3+细胞。接着将所述细胞维持于典型条件下及在第12天再活化。以相同密度接种细胞及在20天期间每周计数两次。如图6中所示,表达4G7-CAR的T-细胞的增殖活性比表达经典FMC63-CAR的细胞的增殖活性高两倍。

[0154] 参考文献

[0155] Arimondo, P.B., C.J. Thomas等人(2006)。“Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates.” Mol Cell Biol 26(1):324-33。

[0156] Atkins, J.F., N.M. Wills等人(2007)。“A case for “StopGo”: reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go).” Rna 13(6):803-10。

[0157] Bierer, B.E., G. Hollander等人(1993)。“Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology.” Curr Opin Immunol 5(5):763-73。

[0158] Boch, J., H. Scholze等人(2009)。“Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.” Science 326(5959):1509-12。

[0159] Choulika, A., A. Perrin等人(1995)。“Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*.” Mol Cell Biol 15(4):1968-73。

- [0160] Christian, M., T. Cermak 等人 (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." Genetics 186 (2):757-61.
- [0161] Cong, L., F. A. Ran 等人 (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science 339 (6121):819-23.
- [0162] Deltcheva, E., K. Chylinski 等人 (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature 471 (7340):602-7.
- [0163] Donnelly, M. 及 G. Elliott (2001). "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14." J Virol 75 (6):2566-74.
- [0164] Doronina, V. A., C. Wu 等人 (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." Mol Cell Biol 28 (13):4227-39.
- [0165] Eisenschmidt, K., T. Lanio 等人 (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." Nucleic Acids Res 33 (22):7039-47.
- [0166] Garneau, J. E., M. E. Dupuis 等人 (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature 468 (7320):67-71.
- [0167] Gasiunas, G., R. Barrangou 等人 (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A 109 (39):E2579-86.
- [0168] Henderson, D. J., I. Naya 等人 (1991). "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production." Immunology 73 (3):316-21.
- [0169] Jena, B., G. Dotli 等人 (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood 116 (7):1035-44.
- [0170] Jinek, M., K. Chylinski 等人 (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science 337 (6096):816-21.
- [0171] Kalish, J. M. 与 P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." Ann N Y Acad Sci 1058:151-61.
- [0172] Li, T., S. Huang 等人 (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." Nucleic Acids Res 39 (1):359-72.
- [0173] Liu, J., M. W. Albers 等人 (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." Biochemistry 31 (16):3896-901.
- [0174] Mali, P., L. Yang 等人 (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science 339 (6121):823-6.
- [0175] Moscou, M. J. 及 A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." Science 326 (5959):1501.
- [0176] Paques, F. 及 P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." Curr Gene Ther 7 (1):49-66.

- [0177] Park, T.S., S.A. Rosenberg 等人 (2011)。“Treating cancer with genetically engineered T cells.” Trends Biotechnol 29 (11):550-7。
- [0178] Peipp, M., D. Saul 等人 (2004)。“Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications.” J Immunol Methods 285 (2):265-80。
- [0179] Perrin, A., M. Buckle 等人 (1993)。“Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions.” Embo J 12 (7):2939-47。
- [0180] Pingoud, A. 及 G.H. Silva (2007)。“Precision genome surgery.” Nat Biotechnol 25 (7):743-4。
- [0181] Porteus, M.H. 及 D. Carroll (2005)。“Gene targeting using zinc finger nucleases.” Nat Biotechnol 23 (8):967-73。
- [0182] Rouet, P., F. Smih 等人 (1994)。“Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease.” Mol Cell Biol 14 (12):8096-106。
- [0183] Sorek, R., C.M. Lawrence 等人 (2013)。“CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea.” Annu Rev Biochem.
- [0184] Stoddard, B.L. (2005)。“Homing endonuclease structure and function.” Q Rev Biophys 38 (1):49-95。

序列表

<110> Cellectis
 <120> CD19特异性嵌合抗原受体及其用途
 <130>
 <150> PCT/US2013/040755
 <151> 2013-05-13
 <150> PCT/US2013/040766
 <151> 2013-05-13
 <150> US 13/892,805
 <151> 2013-05-13
 <150> USP 61/888,259
 <151> 2013-10-08
 <160> 24
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <220>
 <223> 抗-人CD19单株抗体4G7免疫球蛋白 γ 1重链
 <400> 1

```

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1           5           10           15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys
           20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
           35           40           45
Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
           50           55           60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
65           70           75           80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
           85           90           95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
           100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp
           115          120          125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
  
```

130	135	140
Pro Pro Ser Val Tyr	Pro Leu Ala Pro Gly Ser	Ala Ala Gln Thr Asn
145	150	155
Ser Met Val Thr Leu	Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe	Pro Glu Pro
165	170	175
Val Thr Val Thr Trp	Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly	Val His Thr
180	185	190
Phe Pro Ala Val Leu	Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser	Val
195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser	Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn	Val
210	215	220
Ala His Pro Ala Ser	Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro	Arg
225	230	235
Asp Cys Gly Cys Lys	Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser	
245	250	255
Val Phe Ile Phe Pro	Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu	
260	265	270
Thr Pro Lys Val Thr	Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro	
275	280	285
Glu Val Gln Phe Ser	Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala	
290	295	300
Gln Thr Gln Pro Arg	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val	
305	310	315
Ser Glu Leu Pro Ile	Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe	
325	330	335
Lys Cys Arg Val Asn	Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
340	345	350
Ile Ser Lys Thr Lys	Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile	
355	360	365
Pro Pro Pro Lys Glu	Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys	
370	375	380
Met Ile Thr Asp Phe	Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp	
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Ala	Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp	
405	410	415
Thr Asp Gly Ser Tyr	Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser	
420	425	430
Asn Trp Glu Ala Gly	Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly	
435	440	445

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 2
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <220>
 <223> 抗-人CD19单株抗体4G7免疫球蛋白κ轻链
 <400> 2
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
 165 170 175
 Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
 195 200 205
 Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
 210 215 220
 Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <220>
 <223> 抗-人CD19单株抗体4G7免疫球蛋白 γ 1重链之片段-(残基20至140)
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <220>
 <223> 抗-人CD19单株抗体4G7免疫球蛋白 κ 轻链之片段-(残基21至130)
 <400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile

65		70		75		80									
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
			85					90						95	
Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100					105						110	
Arg	Ala	Asp													
		115													
<210>	5														
<211>	116														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	抗-人CD19单株抗体4G7免疫球蛋白κ轻链之片段														
<400>	5														
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1			5					10					15		
Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
			35					40					45		
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
			50					55					60		
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile
65				70						75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85						90				95	
Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100					105						110	
Arg	Ser	Asp	Pro												
		115													
<210>	6														
<211>	15														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	人工序列的描述:合成的寡肽														
<220>															
<223>	接头														
<400>	6														

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro
 245 250
 <210> 8
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <220>
 <223> scFV 4G7形式2
 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala
 130 135 140
 Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
 165 170 175
 Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 180 185 190
 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200 205

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 210 215 220
 Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp
 245 250
 <210> 9
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <220>
 <223> scFV FMC63
 <400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 130 135 140
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
 145 150 155 160
 Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
 180 185 190

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 195 200 205
 Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp
 245 250

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> T-细胞表面糖蛋白CD3 ζ链之片段

<400> 10

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 4-1BB之片段(残基214至255)

<400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

	20		25		30										
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu						
	35		40												
<210>	12														
<211>	41														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<220>															
<223>	T-细胞-特异性表面糖蛋白CD28之片段														
<400>	12														
Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1			5					10					15		
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
			20					25					30		
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
		35					40								
<210>	13														
<211>	69														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<220>															
<223>	T-细胞表面糖蛋白CD8 α 链同种型1前体之片段(残基138至206)														
<400>	13														
Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
1			5						10					15	
Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
			20						25					30	
Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile
			35				40						45		
Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
			50				55						60		
Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys											
<210>	14														
<211>	495														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	人工序列的描述:合成的多肽														

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 290 295 300
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 305 310 315 320
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 325 330 335
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 340 345 350
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 355 360 365
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 370 375 380
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 385 390 395 400
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 435 440 445
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 450 455 460
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 465 470 475 480
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

<210> 15

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<220>

<223> 4G7-CAR形式2

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile
 20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 35 40 45
 Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr
 65 70 75 80
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
 145 150 155 160
 Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser
 165 170 175
 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr
 180 185 190
 Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 195 200 205
 Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro
 245 250 255
 Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro
 260 265 270
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 275 280 285
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 290 295 300
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 305 310 315 320
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 325 330 335
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

	340		345		350														
Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly				
	355						360					365							
Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg				
	370						375					380							
Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln				
385					390				395						400				
Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp				
				405					410					415					
Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro				
			420						425					430					
Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp				
		435							440					445					
Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg				
			450						455					460					
Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr				
465					470						475				480				
Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
				485					490					495					

<210> 16
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <220>
 <223> FMC63-CAR
 <400> 16

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro				
1				5				10					15						
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser				
			20					25					30						
Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp				
			35					40					45						
Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val				
			50					55				60							
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser				
65					70						75				80				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser				

	85		90		95										
Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn
	100		105		110										
Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Lys
	115		120		125										
Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	130		135		140										
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu
145			150		155		160								
Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val
	165		170		175										
Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys
	180		185		190										
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr
	195		200		205										
Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys
	210		215		220										
Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala
225			230		235		240								
Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met
	245		250		255										
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr
	260		265		270										
Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser
	275		280		285										
Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly
	290		295		300										
Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp
305			310		315		320								
Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile
	325		330		335										
Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys
	340		345		350										
Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys
	355		360		365										
Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val
	370		375		380										
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn
385			390		395		400								

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 405 410 415
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 420 425 430
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 435 440 445
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 450 455 460
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 465 470 475 480
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 17

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<220>

<223> 4G7-CAR形式2

<400> 17

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg cagcaccggc 60
 gaggtgcagc tgcagcagag cggaccagag ctgatcaagc caggcgccag cgtgaagatg 120
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctacgtga tgcaactgggt gaagcagaag 180
 ccaggccagg gcctggagtg gatcggctac atcaaccctt acaacgacgg caccaagtac 240
 aacgagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accagcgaca agagcagcag caccgcctac 300
 atggagctga gcagcctgac cagcaggagc agcgccgtgt actactgctg cagaggcacc 360
 tactactacg gcagccgggt gttcactac tggggccagg gcaccaccct gaccgtgagc 420
 tctggcggag gcggctctgg cggaggcggc tctggcggag gcggcagcga catcgtgatg 480
 acccaggctg cccccagcat ccccgtagc ccaggcgaga gcgtgagcat cagctgccgg 540
 agcagcaaga gcctgctgaa cagcaacggc aacacctacc tgtactgggt cctgcagcgg 600
 ccaggccaga gccccagct gctgatctac cggatgagca acctggccag cggcgtgccc 660
 gaccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gccttacc tgcggatcag ccgggtggag 720
 gccgaggacg tgggcgtgta ctactgcatg cagcacctgg agtaccctt caccttcgga 780
 gccggcacca agctggagct gaagcggctg gatcccacca cccccagc cccacggcca 840
 cctaccctg ccccaacct cgccagccag cccctgagcc tgcggcctga agcctgcagg 900
 cctgccgccg gaggagccgt gcacacaagg ggctggact tcgctgcga catctatatc 960
 tgggcccccc tggccgggac atgcgggggtg ctgctgctgt ccttggtgat tacactgtat 1020
 tgcaaacggg gccggaagaa gctgctgtac atcttcaagc agcccttcat gcggcccgtg 1080

cagaccaccc aggaggagga cggctgcagc tgccggttcc ccgaggaaga ggaaggcggc 1140
 tgcgagctgc gggatgaagt cagccggagc gccgacgcc cagcctacca gcagggccag 1200
 aaccagctgt acaacgagct gaacctggga cggcgggagg agtacgacgt gctggacaag 1260
 cggcggggac gggaccccga gatgggcggc aagcctcgcc ggaagaatcc ccaggagggc 1320
 ctgtacaacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag 1380
 ggcgagcggc gccggggcaa gggccacgac ggctgtacc agggcctgag caccgccacc 1440
 aaggacacct acgacgccct gcacatgcag gcctgccac cccggtga 1488

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡肽

<220>

<223> 信号肽

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
 20

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡肽

<220>

<223> 信号肽

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
 20

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

tgtgccaca gatatccaga accctgacc tgccgtgtac cagctgaga

49

<210> 21
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <220>
 <223> 重复TRAC_T01-L
 <400> 21
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

<211> 530
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <220>
 <223> 重复TRAC_T01-R
 <400> 22
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala

	245	250	255
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly			
	260	265	270
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys			
	275	280	285
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala			
	290	295	300
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly			
305	310	315	320
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			
	325	330	335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn			
	340	345	350
Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val			
	355	360	365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala			
	370	375	380
Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu			
385	390	395	400
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala			
	405	410	415
Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala			
	420	425	430
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val			
	435	440	445
Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val			
	450	455	460
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln			
465	470	475	480
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu			
	485	490	495
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr			
	500	505	510
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala			
	515	520	525
Leu Glu			
	530		
<210>	23		
<211>	2814		

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述:合成的多核苷酸	
<220>		
<223>	TRAC_T01-R TALEN	
<400>	23	
atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgaat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt	ggtcggcgcc	acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggccac	cgttacagtt	ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag caggcgttgg agacggtcca gcggctgttg 660
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc ccccagcagg tggtggccat cgccagcaat 720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 900
cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agccacgatg	gcggaagca	ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtggcaag 1140
caggcgttgg	agacggtgca	ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc cacggcttga ccccggagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccagc caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccgg	agcagggtgt	ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acgggtcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag caggcgttgg agacggtcca gcggctgttg 1680
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc ccggagcagg tggtggccat cgccagcaat 1740
attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg caggcgttgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg 1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 1920

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctctgcgctc tggcctgcct cggcgggctg	2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccc tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggcca cgaaatgcag	2520
aggtagctgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tctcggcca cttcaagggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggetgaac cacatcaca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttc cggccgactg ataa	2814
<210> 24	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸	
<400> 24	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggctcggc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
acgggtggcg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgatggcg caatgcaactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggctccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcctgag agacggtcca gcgctgttg	780
ccggctgctg gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtggccat cggcagcaat	840
attggtggca agcaggcgtt ggagacggtg caggcctgtg tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag	1020

caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggtctgtg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccggag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccag	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	1800
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	1860
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtcgccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcacccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggtccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtaccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctctgatcg	gcgcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

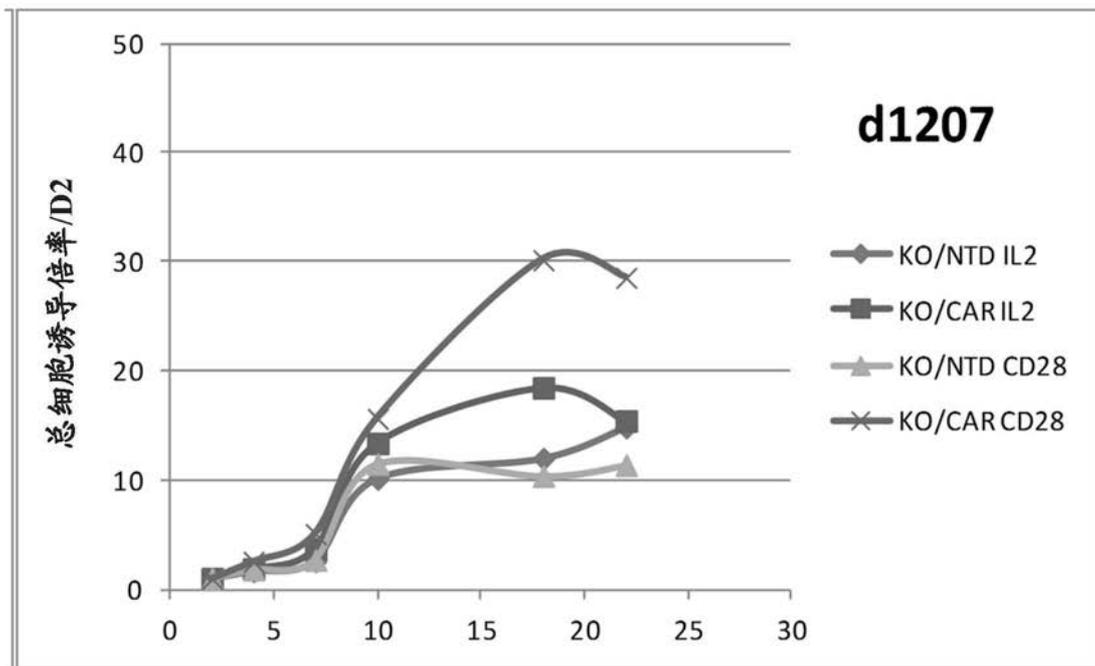
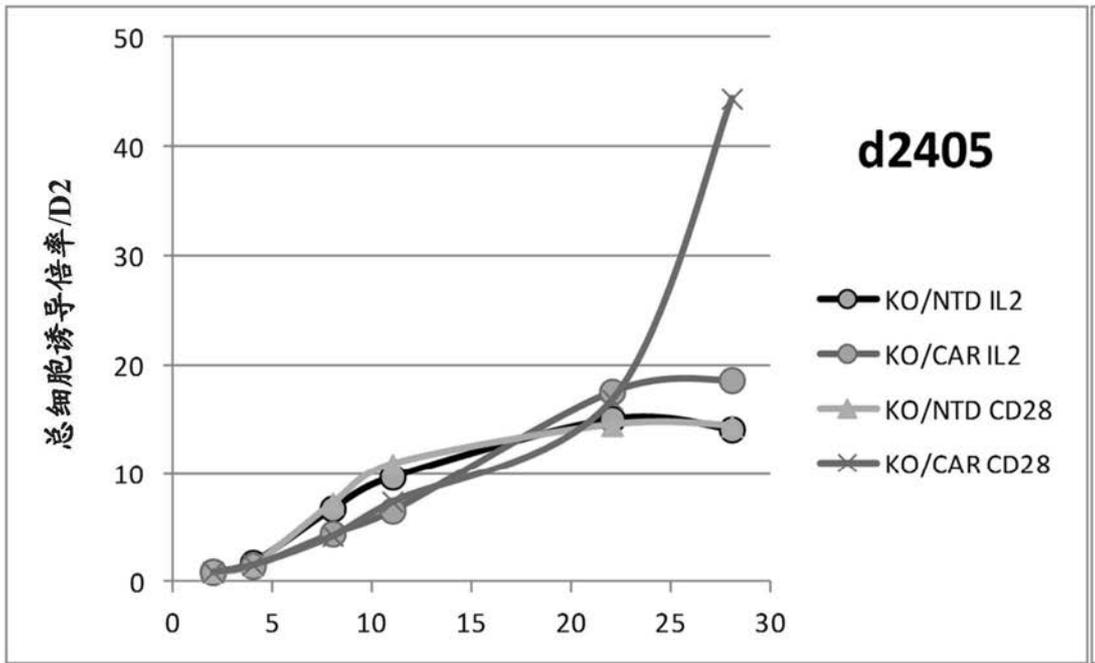


图1

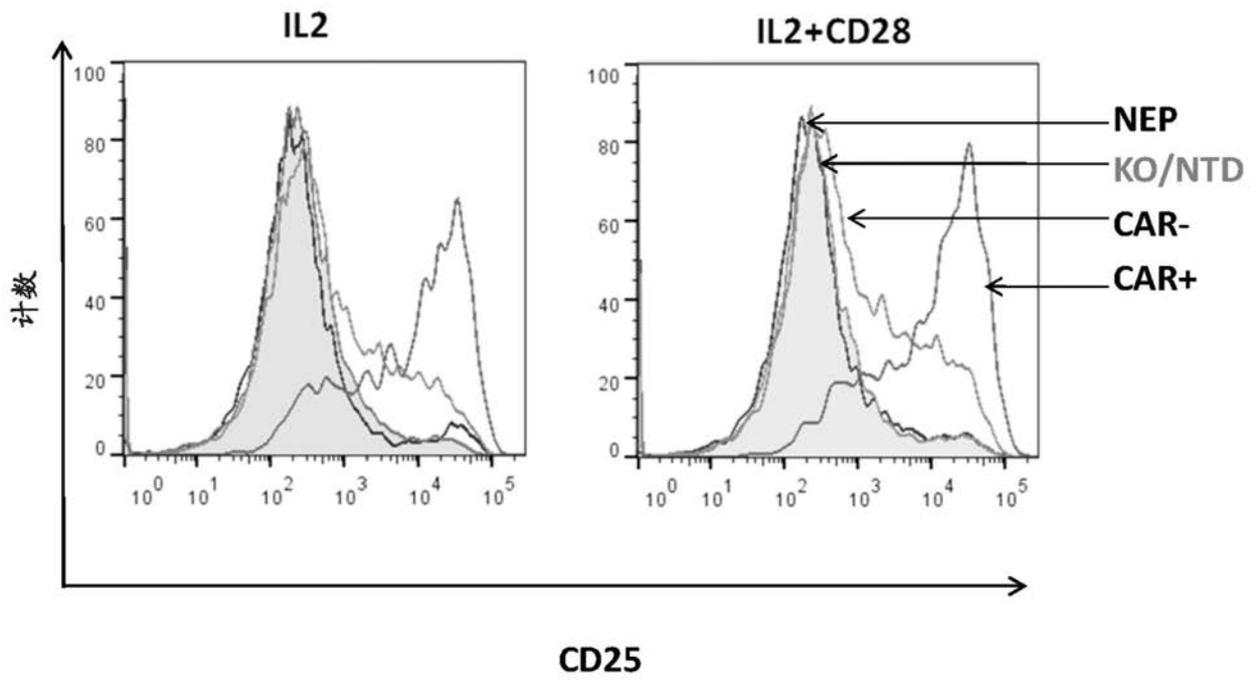


图2

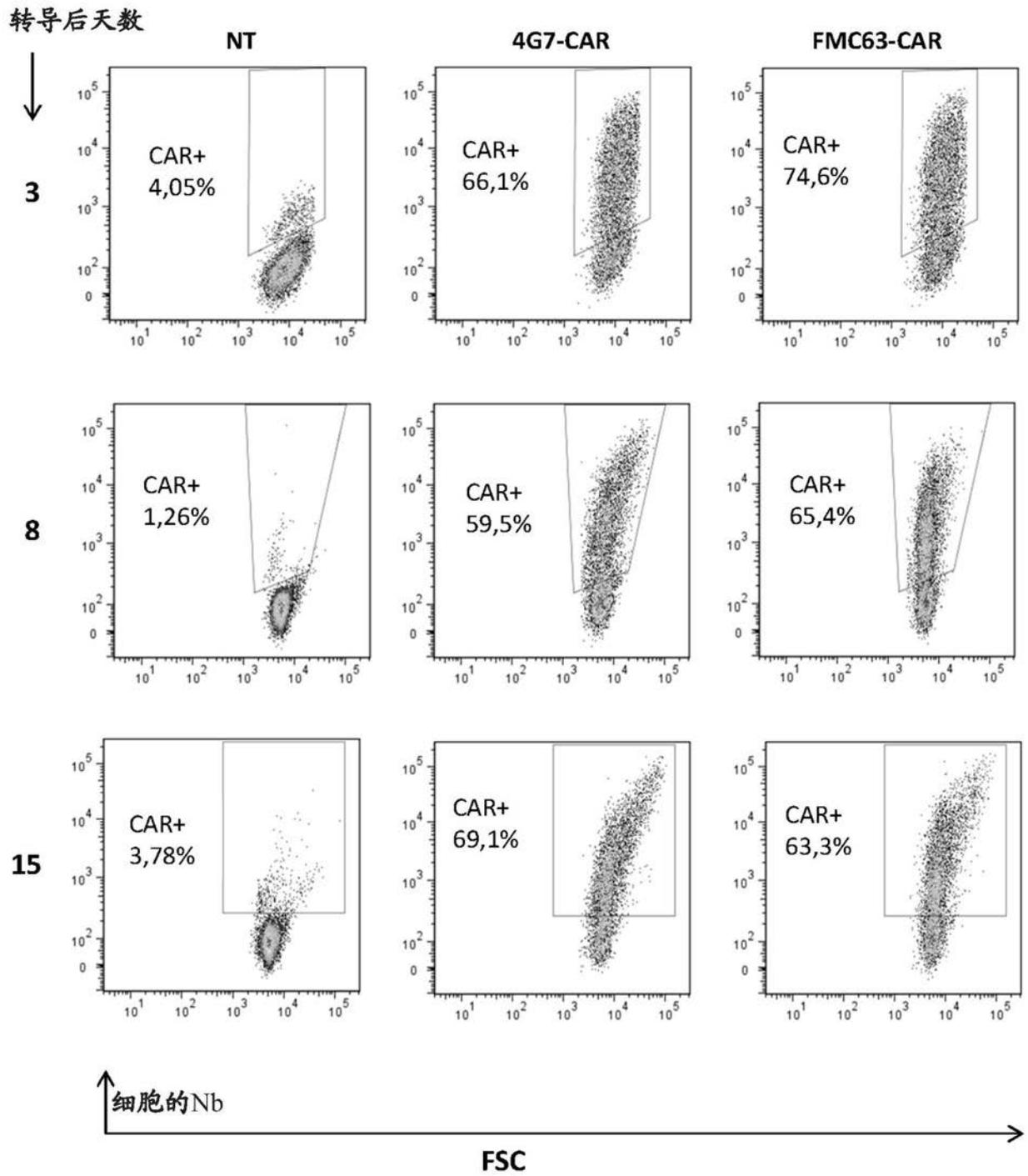


图3

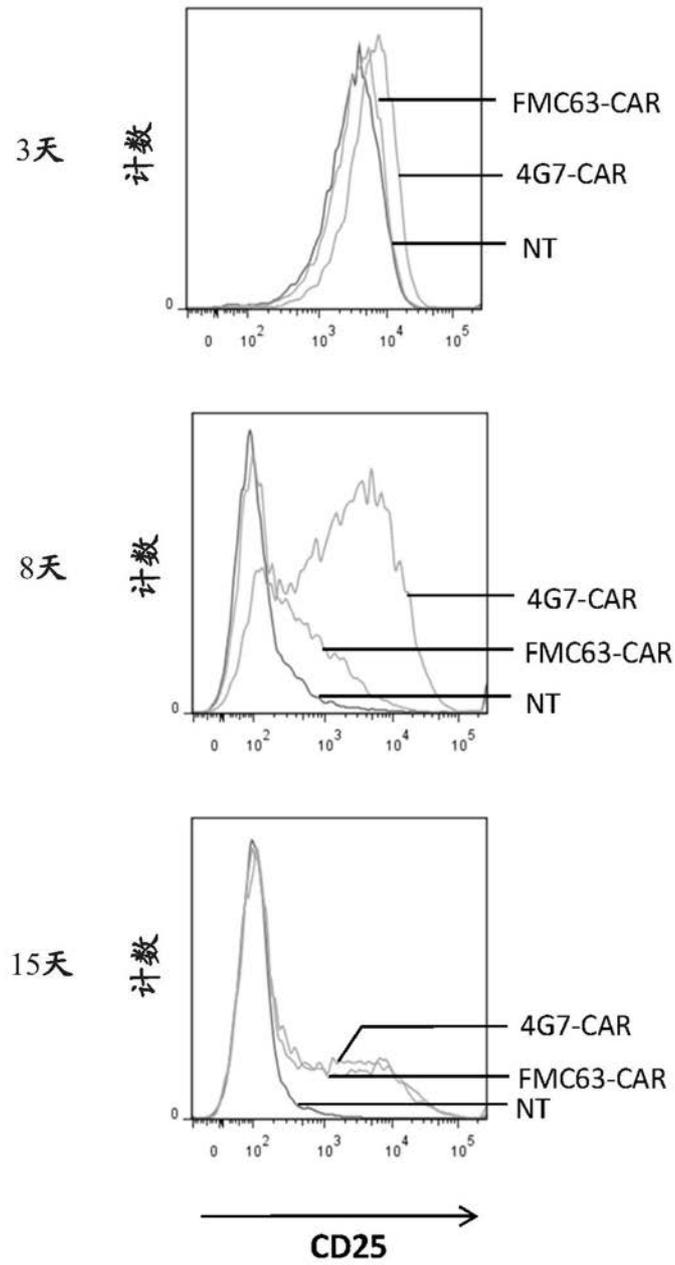


图4

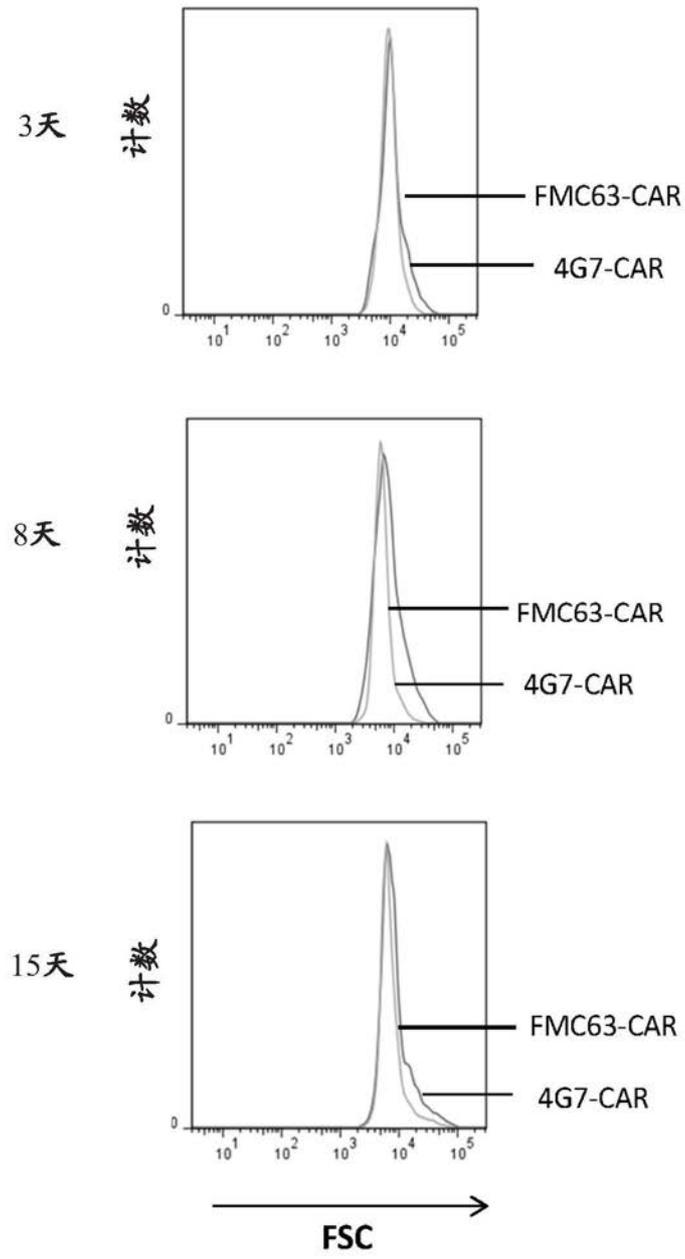


图5

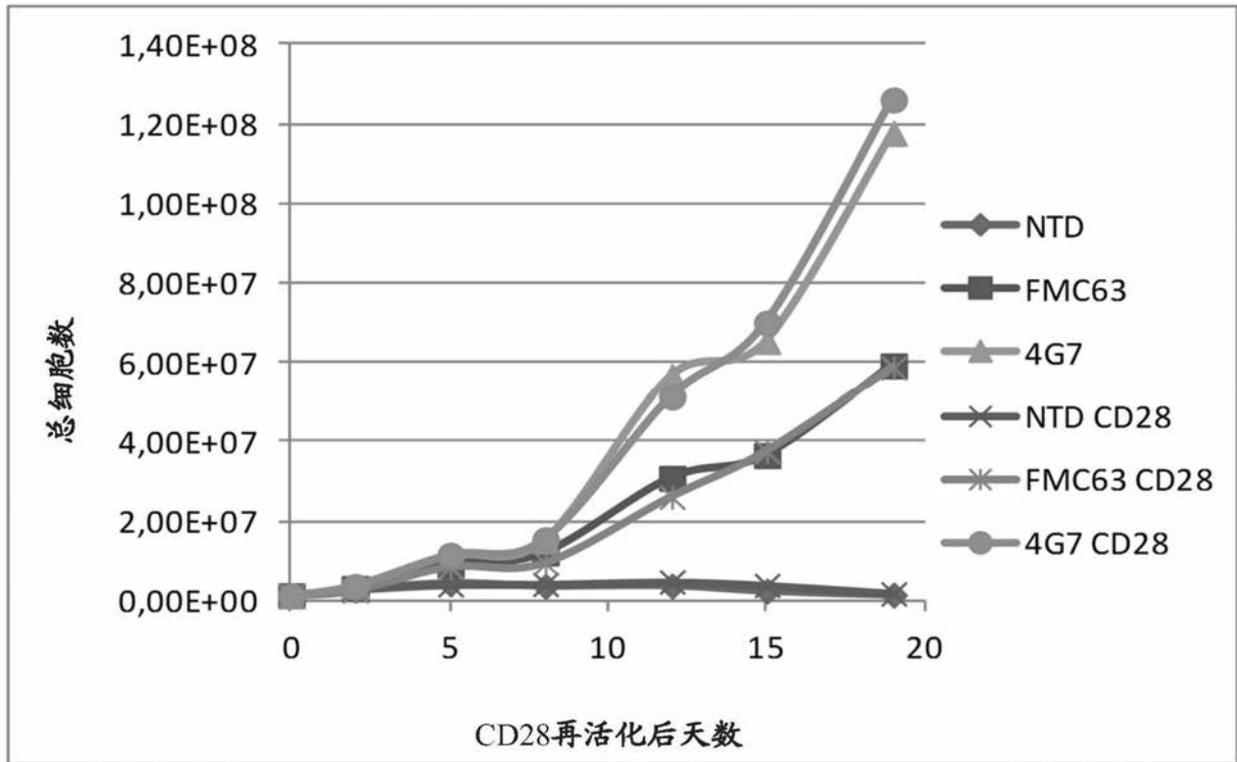


图6